44, 72, 84

3567(8)

动 物 学 研 究 1994，15（4）：44，72，84 CN 53-1040／Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

一种简捷有效的组蛋白提取法

A SIMPLE, EFFICIENT PROCEDURE FOR ISOLATING HISTONE

刘建民，李靖炎

关键词 小牛胸腺，组蛋白提取
Key words Calf thymus, Isolation of histone

Q512.703

从组织细胞中提取组蛋白的方法主要有3类：(1)酸抽提，(2)高离子强度解离，(3)精蛋白替代。其中以酸抽提法最为常用。但该方法的传统操作包括分离纯化细胞核、染色质等步骤，在此过程中易造成所要提取蛋白的降解，因而保持低温和使用蛋白酶抑制剂成为必需。但抑制剂有时会带来不良影响，并对有些生物如一些低等生物其效果又不甚理想。另外，此传统操作所获的组蛋白往往混有一些酸溶性的非组蛋白成分。

从细胞化学的研究中，已知经甲醇固定的细胞仍可用稀盐酸抽出其核内组蛋白。基于此我们建立了一种先固定、后酸抽提组蛋白的提取方法。此方法不仅克服了上述不足，而且更为简捷有效，适用范围更广。现以小牛胸腺为材料，通过与其它方法的比较阐述其优点。

1 材料和方法

1.1 材料 新鲜小牛胸腺。

1.2 组蛋白的提取（除注明外，均在冰浴下操作） 将胸腺用生理盐水洗净，除去表面结缔组织。称取5份组织(0.3 g／份)，将其中两份剪成约1 mm^3的小块，先用甲醇固定40 min。另3份按以下方法处理：于小烧杯中将组织快速剪成肉糜，都加入5 ml 0.3 N HCl溶液，并向其中两份分别加入浓的PMSF和$NaHSO_3$溶液，使终浓度分别为1.2 mM和50 mM，另一份不加抑制剂。慢速搅拌抽提30 min。10000 r／min离心5 min，弃沉淀，上清液加入40 ml预冷丙酮，-10℃下过夜充分沉淀蛋白质。经甲醇固定的两份材料，也作如上处理，但不使用蛋白酶抑制剂，且其中1份在室温(20℃)下操作。8000 r／min离心5 min，收集5份蛋白沉淀，各加入0.3 N HCl溶液5 ml，轻轻搅匀再溶解蛋白质，高速离心(18000 r／min，5 min)弃不溶的沉淀物，上清液如上所述经丙酮沉淀蛋白质并离心收集。经丙酮洗涤两次，真空冷冻干燥，称重后备用。

1.3 SDS-PAGE及光密度扫描 SDS-PAGE参照Laemmli的方法，制得18% Acr／0.12% bis的分离胶。将上述制备的蛋白质制成等体积电泳样品，等体积点样电泳。考马氏亮兰R250染色。

电泳胶经激光密度扫描记录(LKB 2202 Ultrascan laser Densitometer)。

2 结果与讨论

5种条件下得到的组蛋白量及换算出的得率如表1所示。

（下转第72页）

本文1993年11月15日收到，1994年2月26日修回

（上接第 44 页）

表 1 5 种条件下获得的组蛋白量及其得率

Tab. 1 Quantity of histone isolated from calf thymus under five conditions

条件	组蛋白量(0.3 g 组织)(mg)	得率(每 100 g 组织)(g)
A	3.58	1.193
B	3.61	1.203
C	3.57	1.190
D	3.08	1.027
E	3.05	1.017

A. B. C：材料不经固定，A. 不使用抑制剂，B. C. 分别使用$NaHSO_3$和PMSF作为抑制剂；D. E：材料经甲醇预先固定，D 在冰浴下操作，E. 在室温(20℃)下操作

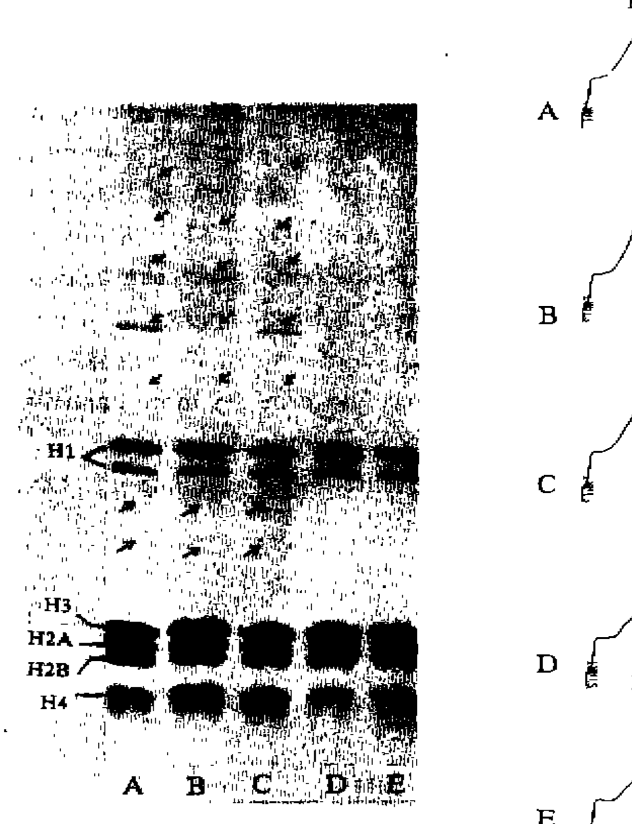


图 1 5 种条件下获得的组蛋白的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 1 SDS-PAGE comparison of histones isolated under five conditions

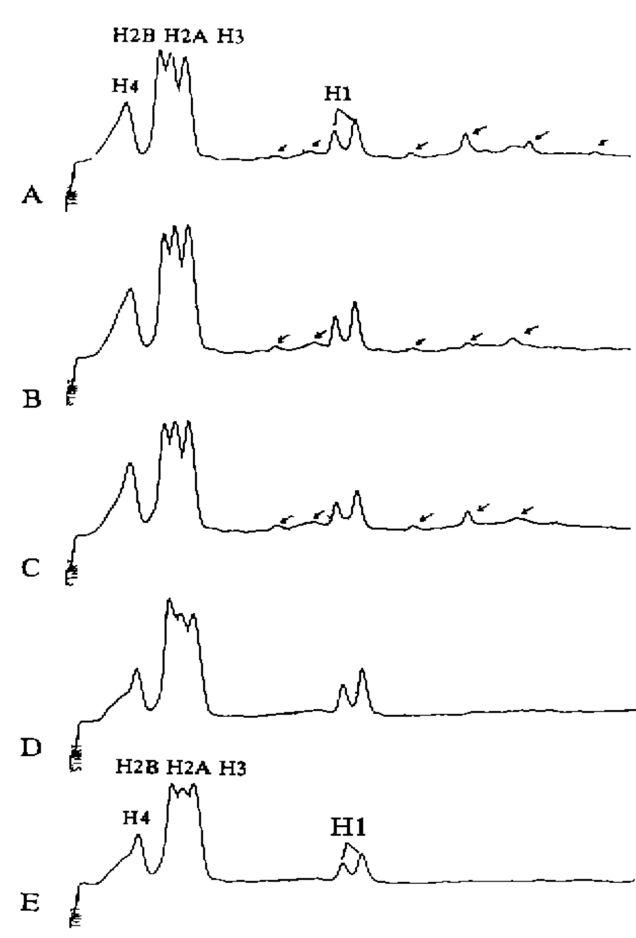


图 2 光密度扫描图谱

Fig. 2 Densitometry scanning patterns of the gel of Fig. 1

图中字母意义同上表、小箭头所指为组蛋白带或峰

（下转第 84 页）

and chronic toxicity tests. The duration of the chronic test was 20 d. At 19−20℃, the subchronic exposure was lasted 19 d for less than 24 h old *D. magna* while it was lasted 16 d for 4 d old *D. magna*. The 24 and 48 h EC_{50} for *D. magna* were 489 and 245 μg / L, respectively. Depended on the population of the first brood, the LOEC and NOEC were 160 and 80 μg / L in the chronic test, respectively, which were similar to those in 19 d subchronic test (200 and 100 μg / L). The results indicated that the population of the first brood was a sensitive endpoint.

Key words *Daphnia magna*, PCP, Acute toxicity, Subchronic toxicity, Chronic toxicity

(上接第72页)

从表中可知材料经甲醇预先固定后其得率与不固定者很接近，只略低一点。经固定后，操作温度对得率无影响。5种条件下的组蛋白提取物其电泳图谱如图1所示。

5种条件下都得到了5种组蛋白组分的6条分离电泳带(其中H_1有两条亚带)。但材料是否经甲醇预先固定其电泳图谱有所不同。不经固定者(图1中的A、B、C)除组蛋白的条带外，还有许多浅的杂蛋白条带；而经固定者(图1中的D、E)未见有杂蛋白条带。扫描图谱(图2)也显示出相同结果。

这些事实表明由于提取过程大为简化缩短，即便未使用蛋白酶抑制剂，也能获得完整的5种组蛋白而无水解迹象；若材料经甲醇预先固定，不仅无需使用蛋白酶抑制剂，而且在室温下操作也未见有降解迹象，并且所获组蛋白的纯度也大为提高。原因是甲醇的固定一方面使细胞内蛋白酶完全失活，另一方面细胞内原是酸可溶性的一些中性乃至弱碱性的蛋白得以固定，不再易随碱性较强的组蛋白一同被抽提出来。

值得注意的是经甲醇固定后组蛋白的得率稍有下降，但若从纯度提高来考虑，这种下降并不显著。且若将固定后的细胞磨碎后进行抽提，得率还会有所提高，而对纯度无多大影响。

以往的酸抽提法自60年代末以来无多大改进一直沿用至今。本方法另辟途径，采用甲醇预先固定、再酸抽提、二次酸溶解去杂蛋白的提取方法，不仅简化了操作，克服了以往方法的缺点，且适用性更广，效果更佳。

文建凡　　李靖炎
Wen Jianfan　Li Jingyan
(中国科学院昆明动物研究所细胞及分子进化实验室　昆明　650223)
(*Laboratory of Cellular and Molecular Evolution, Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica* 650223)